

LPS로 자극된 macrophage RAW264.7 세포에서 ascochlorin에 대한 단백질체 분석

장영채*

대구가톨릭대학교 의용생체공학연구소, 대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

Received March 24, 2008 / Accepted April 12, 2008

Proteome Analysis of Responses to Ascochlorin in LPS-induced Mouse Macrophage RAW264.7 Cells by 2-D Gel Electrophoresis and MALDI-TOF MS. Young-Chae Chang*. *Research Institute of Biomedical Engineering and Department of Pathology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, 705-034, Korea* - Ascochlorin (ASC) is prenyl-phenol compound that was isolated from the fungus *Ascochyta viciae*. ASC reduces serum cholesterol and triglyceride levels, and suppresses hypertension, tumor development, ameliorates type I and II diabetes. Here, to better understand the mechanisms by which ASC regulates physiological or pathological events and induces responses in the pharmacological treatment of inflammation, we performed differential analysis of the proteome of the mouse macrophage RAW264.7 cells in response to ASC. In this study, we used a proteomic analysis of LPS-induced RAW264.7 cells treated by ASC, to identify proteins potentially involved in inflammatory processes. The RAW264.7 cell proteomes with and without treatment with ASC were compared using two-dimensional electrophoresis (2-D SDS-PAGE), matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and bioinformatics. The largest differences in expression were observed for the calreticulin (4-fold decrease), β -actin (4-fold decrease) and vimentin (1.5-fold decrease). In addition, rabaptin was increased 3-fold in RAW264.7 cells treated with ASC. The expression of some selected proteins was confirmed by RT-PCR analysis.

Key words : Ascochlorin (ASC), lipopolysaccharide (LPS), macrophage RAW264.7 cells, two-dimensional electrophoresis (2-D SDS-PAGE), matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

서 론

염증(inflammation)은 조직의 변질, 순환 장애와 삼출 그리고 조직의 증식 등의 증상을 유발하는 복잡한 병변이다. 염증은 여러 경로의 감염(infection) 및 생체 내 대사산물 중 자극성 물질에 대한 생체 내 방어적 반응을 가리키며[29], 모든 질환이 진행되는 과정 중 반드시 수반될 뿐만 아니라 이러한 염증이 과도해질 때 세포 사멸이 초래 된다[15]. 염증은 다양한 세포들과 사이토카인(cytokine)들이 관여하는 일련의 과정이며[52], 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)와 같은 외부 자극원 또는 아라키돈산(arachidonic acid) 대사체와 같은 내부 자극원들을 주요 매개로 하여 대식세포(macrophage), 과립세포(granulocyte)와 같은 면역세포들이 염증 부위로 유입하여 축적되는 것을 주요 특징으로 한다. 특히, 대식세포는 세균감염에 대한 숙주의 비특이적 면역반응에 중요한 역할을 하는 세포로서 LPS와 같은 자극물질에 노출되면 세포의 활성이 유도하는 기능을 갖고 있다[1].

이에 본 연구에서는 염증 발병에서 프레닐 페놀계(prenyl-phenol compound) 화합물이 어떠한 영향을 미치는지를 조

사하고자 프로테오믹스(proteomics, 단백질체학) 연구를 수행 하였다. 프레닐 페놀계 화합물인 ascochlorin (ASC, Fig. 1)은 균류(fungus)인 *Ascochyta viciae*로부터 분리된 생리 활성 물질로 항바이러스, 항암 및 항균 활성을 나타낸다[19]. 다른 문헌 보고에 의하면 ASC 및 ASC 유도체들은 면역반응 조절, 지질 강하 그리고 혈압 강하에 효과를 나타낸다고 알려져 있다[7,16]. 또한 ASC 및 ASC 유도체는 제 1형 및 제 2형 당뇨병의 경과를 호전시키며, 신장암(Caki-1)세포와 골 육종(U2OS) 세포에서 AP1의 전사 활성 억제를 통한 MMP-9 발현을 저해하여 암전이 억제 효과를 가지고 있음이 보고되었다[16]. 또한 ASC 및 ASC의 다양한 유도체에 대한 또 다른 생물학적 기전 연구 결과, peroxisome proliferator-activator receptor- γ (PPAR- γ)를 비롯한 핵 내 전사인자의 활성억제[4,34,47] 및 미토콘드리아에서 분리된 유비퀴논(ubiquinone) 의존적 전자수송을 방해하여 산화적 인산화를 저해하는 기능이 밝혀졌다 [25,44,47,48]. 특히 최근 인간 골 육종세포에 ASC를 처리한 후 단백질 발현 변화를 프로테오믹스로 관찰한 결과 ASC가 epidermal growth factor receptor (EGFR)의 발현을 감소시킨다는 연구가 보고되었다[19].

본 연구의 주요 실험 방법인 프로테오믹스는 O'Farrell [33]에 의해 처음 기술된 방법으로 단백 혼합물을 등전점(isoelectric point)과 분자량(molecular weight)에 따라 분리

*Corresponding author

Tel : +82-53-650-4848, Fax : +82-53-650-4834

E-mail : ycchang@cu.ac.kr

하여 단백질을 양적 그리고 질적으로 동시에 분석하는 기술이다. 프로테오믹스는 유전자 정보로부터 만들어진 프로테오믹스(ome, 단백질체)를 대상으로 유전자의 기능 및 단백질의 기능 이상과 구조변형 유무 등을 규명하여 질병 과정 등을 추적하는 기술이다. 유전자(gene)와 오메(ome; 전체)의 합성어인 게놈(genome)이 사람이 지닌 모든 유전정보의 집합체라면 단백질(protein)과 오메의 합성어인 프로테오믹스는 특정 세포나 특수 상황에서 생성되는 단백질의 집합체이다. 최근에는 고해상도 이차원 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법(high resolution 2D-PAGE)과 같은 새로운 방법을 이용하여 단백질을 더욱 정밀하게 규명하고 있다[11,23]. 특히, 유전자 수준이 아닌 실제 기능을 갖는 단백질의 발현 변화를 질량 분석법(mass spectrometry) 기술과 접목하여 비교적 손쉽고 빠르게 많은 시료를 분석할 수 있어, 다양한 질병의 생물지표(biomarker) 개발에 이용하는 등 그 활용 범위가 점차 확대되고 있다. 또한 최근에는 항암활성을 갖는 약물에 대한 세포 내 표적 유전자를 찾기 위해 프로테오믹스를 사용하고 있는 것으로 알려져 있다[8,19].

따라서 본 연구는 LPS 처리에 의해 활성화된 mouse macrophage RAW264.7 세포에 ASC를 처리한 후 이차원 전기영동법을 이용하여, 단백질의 발현 변화 및 양상을 규명하고 단백질 지도의 확립을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO) 그리고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay reagent)는 Sigma Chemical Co. (MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Urea, CHAPS, DTT, Phamalyte (pH 3-10) 및 IPG DryStrips (pH 3-10, pH 4-7)은 Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA)로부터 구입하였고, Modified porcine sequencing grade trypsin은 Promega (WI, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Coomassie Brilliant Blue R-250과 Bradford protein assay reagent는 Bio-Rad Laboratory Inc. (Hercules, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

세포 배양

Mouse macrophage RAW264.7 세포는 American type culture collection (MD, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. RAW264.7세포는 10% 혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% 항생제를 함유한 DMEM (dulbecco's modified Eagle's medium)-high glucose 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 배양하였으며 2~3일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 혈청, 항생제 그리고 DMEM-high

glucose 배지는 모두 Gibco-BRL (NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

세포독성 분석(MTT assay)

RAW264.7 세포를 96 well tissue culture plate (Falcon, USA)에 1×10⁵ cells/ml로 각 well 당 100 μl씩 분주하여, 24 시간 동안 배양 후 실험에 사용하였다. RAW264.7 세포에 LPS를 단독 혹은 LPS와 ASC를 함께 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 12시간 후 약물이 포함되어 있는 배지에 MTT reagent (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 후 배지를 제거하고 DMSO를 넣어 microplate reader (BMG lab-technologies)로 흡광도(540 nm)를 측정하였다. 세포의 생존율은 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 나타내었다.

프로테오믹스(Proteomics, 단백질체학)

단백질 추출

RAW264.7 세포에 LPS를 단독 혹은 LPS와 ASC를 함께 처리한 후 4°C의 PBS buffer (phosphate buffered saline, 0.01 M, pH 7.4)로 2~3회 washing하여 세포를 수거하였다. 수거한 세포를 lysis buffer (5 mM EDTA, 9.5 M urea, 4% (v/v) CHAPS, 65 mM DTT, protease inhibitors (complete kit, Roche Diagnostics, Germany))를 넣어 상온에서 1시간 이상 반응한 후 상온에서 15분간 12,000 rpm으로 원심분리기틀 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Bradford법으로 정량한 후 동일한 양의 단백질을 이차원 전기영동으로 분석하였다.

이차원 전기영동

pH 3-10의 IPG strips (readyStrip IPG strip, Bio-Rad)에는 300 μg의 단백질과 pH 4-7의 IPG strips에는 400 μg의 단백질을 각각 첨가하여 등전점(isoelectric focusing, IEF) 전기영동을 수행하였다. 이차원 전기영동 장치(SE600 system, Amersham Pharmacia)에 단백질과 IPG strips을 넣고 20°C에서 12시간 동안 rehydration하고 IPG strips을 Bio-Rad PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad Laboratory Inc.) 장치에 넣어 250 V에 30분, 10,000 V에 3시간 그리고 10,000 V에서 65,000 V로 승압될 때까지 12시간 이상의 조건 하에서 focusing을 수행하였다. 등전점 전기영동 후 equilibration buffer (1.5 M Tris-C1 (pH 8.8), 6 M Urea, 2% SDS, 75% glycerol)에 1% DTT를 첨가하여 IPG strips를 30분간 equilibration 후 2.5% IAA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 첨가하여 다시 30분간 equilibration 하였다. Equilibration된 IPG strips를 SDS를 함유한 12% polyacrylamide gel에서 100 V에 30분, 120 V에 2시간, 130 V에 2시간, 140 V에 2시

간 동안에서 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)하여 단백질을 분자량에 따라 분리하였다.

이차원 전기영동 후 겔 염색

이차원 전기영동 후 겔(gel)을 fixing buffer (3% phosphoric acid, 50% ethanol)에 30분간 고정하고 멸균된 3차 증류수로 30분간 washing하고 equilibration buffer (34% ethanol, 3% phosphoric acid, 17% ammonium sulfate)에 30분 동안 equilibration 한 후 staining buffer (34% ethanol, 3% phosphoric acid, 17% ammonium sulfate, 0.1% coomassie blue G-250)를 이용하여 겔을 염색하였다. 12시간 이상 염색 후 멸균된 3차 증류수로 72시간 이상 겔을 탈 염색하였다.

겔 이미지 분석

이차원 전기영동을 한 겔 상의 염색된 단백질 발현 양상을 UMAX PowerLook 1120 scanner (UMAX Technologies, Inc. Dallas, USA)를 이용하여 300 dpi의 해상도로 겔의 이미지를 수치화하였다. 수치화한 이미지를 이미지 분석 프로그램인 PDQUEST software (version 7.0.1, Bio-Rad)를 이용하여 분석하였고, 단백질에 대한 각 spot의 발현 정도는 유효한 spot의 농도를 기준으로 평준화하였다.

겔로부터 단백질 추출

발현 정도의 변화가 있는 각각의 단백질에 대한 spot을 선정하여 단백질을 추출하였다. 선정한 겔 상의 단백질 조각에 대해 2배 부피의 washing buffer (50% CH₃CN/H₂O (v/v))를 넣어 15분간 상온에서 washing 후 다시 washing buffer (100% CH₃CN)로 washing 하였다. 겔 조각이 흰색으로 변할 때까지 washing 후 washing buffer를 제거하고 rehydration buffer (0.1 M NH₄HCO₃)를 사용하여 5분간 재수화하였다. 재수화한 겔 조각에 rehydration buffer와 동일한 부피의 washing buffer (100% CH₃CN)를 넣어 상온에서 15분간 반응시킨 후 첨가한 모든 buffer를 제거하여 회전 진공 농축기 (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 1시간 건조하였다. 건조된 겔 조각을 trypsin (50 ng/μl, Promega, Madison, WI)이 포함된 digestion buffer (5 mM CaCl₂, 50 mM NH₄HCO₃)를 넣어 4°C에서 1시간 반응시켰다. Trypsin과 digestion buffer 넣어 37°C에서 겔 조각을 12~16시간 반응 후 stop buffer (25 mM NH₄HCO₃)를 넣고 15분간 반응을 중지하고 elution buffer (100% CH₃CN)를 넣어 15분간 단백질을 추출하였다. 상등액을 E-tube에 옮기고 남은 겔 조각에 0.1% TFA (trifluoroacetic acid, Sigma Chemical Co. MO, USA)와 washing buffer (60% CH₃CN)를 넣은 후 15분간 반응시켜 상등액을 E-tube에 옮겨 담는 과정을 2회 수행하였다. 반응과정에서 분리된 상등액을 모두 혼합하여 회전 진공 농축기를 사용하여 완전히 건조시키고 단백질을 0.5% TFA에 matrix (α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) 5 mg/ml

을 넣어 용해하였다. 용해한 단백질과 matrix를 동일한 부피로 혼합한 후 단백질을 단편화하였다.

단백질 동정

단편화한 단백질을 질량 지문 모듈(mass fingerprint module)에 의한 단백질 동정을 위해 단백질 서열정보를 동정하기 위해 질량 분석기 Voyager DE-STR MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였다. 양 이온 방식(positive ion mode)에서 가속화 전압 (accelerating voltage)은 20 kV로 200 ns 간격으로 분석하였다. 분석한 각각의 단백질 spot은 mass spectrum을 이용하여 확인하였다.

데이터베이스 조사

질량 스펙트럼을 이용하여 확인한 spot은 peptide fingerprinting을 이용하여 단백질의 정성을 확인하였다. Peptide fingerprinting에는 MS-FIT (protein prospector V 4.27.2, <http://prospector.ucsf.edu>) 프로그램을 사용하였고, 데이터베이스는 Swiss-Prot와 NCBI nr 웹사이트를 이용하여 각각의 단백질의 분자량과 등전점을 분석하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RAW264.7 세포에 LPS (2 μg/μl)와 ascochlorin (10 μM)을 처리하여 12시간 동안 배양하였다. RNA는 TRIzol (Sigma Chemical Co. MO, USA)을 이용하여 분리하였고, 역전사 효소인 Moloney murin leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 이용하여 역전사 반응을 시켜 500 ng의 RNA를 획득한 후 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 ERP60, Rabaptin-5, Vimentin, β -actin의 primer를 이용하여 DNA를 증폭시켰으며 1% agarose gel로 전기영동 하여 DNA의 발현 정도를 확인하였다. RT-PCR 실험에 사용한 primer (Bionics, USA)는 주문 제작하였으며 primer sequence는 Table 1에서 확인할 수 있다. 실험 결과에 대한 각각의 RNA의 발현은 GAPDH 유전자로 표준화하였다.

통계학적 분석

실험결과에 대한 통계처리는 각 실험 군 별로 다양성 분석방법을 사용하였다. 다양성 분석에는 Duncan [9]의 다중 검정방법을 이용하였고, 통계처리 후 p 값이 0.05 미만일 경우(p<0.05) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

RAW264.7 세포에 대한 ascochlorin의 세포독성 효과

RAW264.7 세포에 대해 LPS 및 ASC에 대한 세포 생존률을 MTT assay 방법으로 확인하였다(Fig. 1). RAW264.7 세포에 각각 무혈청(0.1% FBS)과 혈청(10% FBS)을 함유한 배지에 LPS와 ASC를 각각 혹은 함께 12시간 동안 처리

Table 1. Conditions for PCR amplification of the genes studied

Gene	Primer sequence (5' to 3')	No. of cycles	Annealing temp.	Linear cycle range
ERP 60	forward: gagaagcagatgaaggacaagca reverse: aaggggggggggtaatgggg	28	69°C	25-30
Rabaptin-5	forward: gacaatgacatgtttaagat reverse: ttcataattggaacacatatca	30	57°C	26-30
Vimentin	forward: actcttgctccgggaccccaga reverse: cttgtcgatgtagttggcaa	26	66°C	25-30
β-actin	forward: aggggtgatgggtgggtatggg reverse: caggatctcatgaggtatgc	27	55°C	27-30

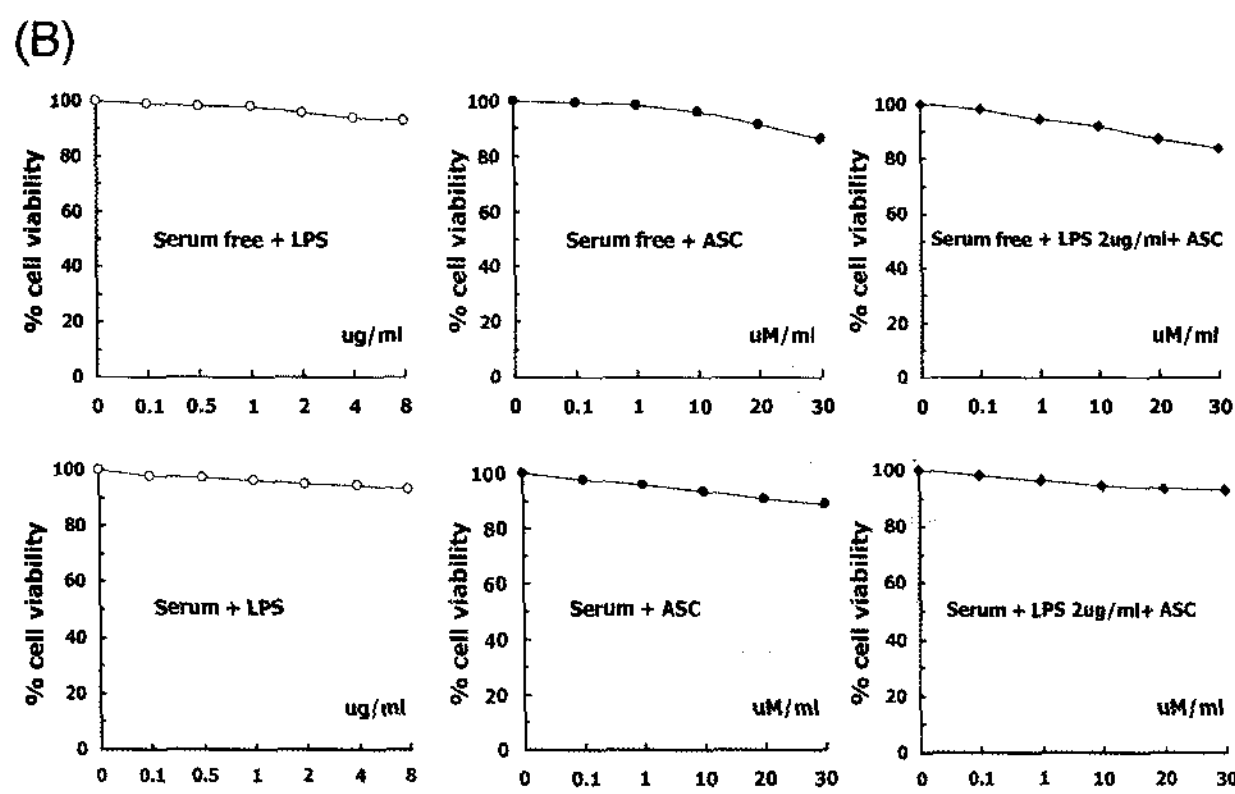
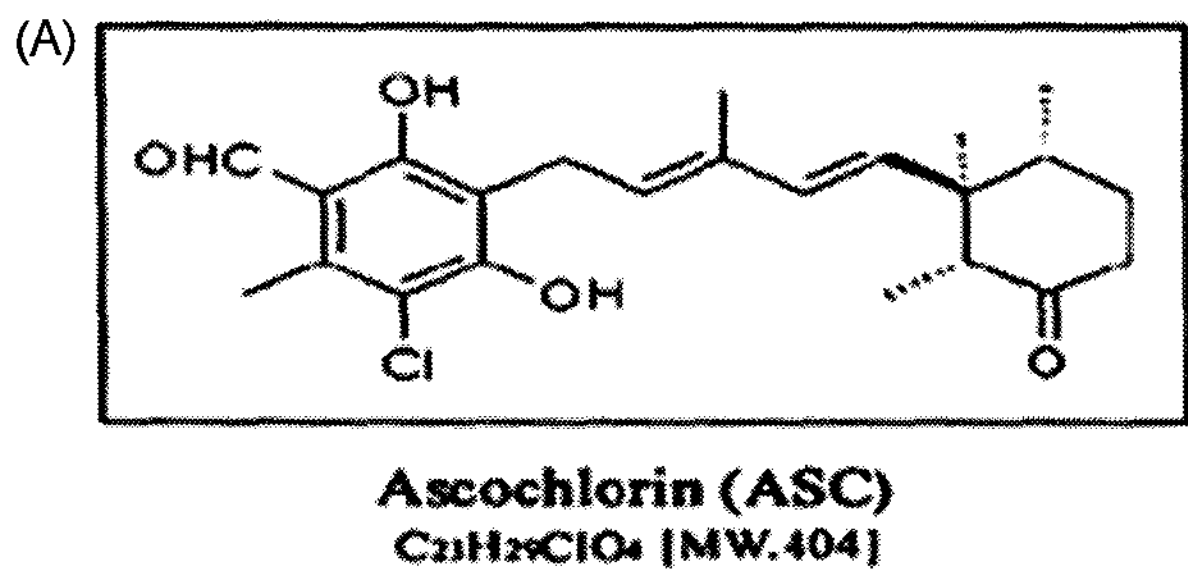


Fig. 1. Chemical structure of ascochlorin (ASC) and effects of LPS and ascochlorin on the viability of RAW 264.7 cells. RAW264.7 cells were treated LPS and ASC respectively or combinationally in serum free (0.1% FBS) or serum (10% FBS) and the cell viability was tested by MTT assay after 12 hr incubation.

하여 대조군에 대한 실험군의 세포 생존률을 백분율로 나타내었다.

LPS는 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8 µg/µl 농도로 처리하였고, ASC는 0.1, 1, 10, 20, 30 µM 농도로 각각 처리하였다. LPS를 처리한 RAW264.7 세포는 8 µg/µl 의 농도에서 10% 세포 생존률이 감소하였고, ASC를 처리한 RAW264.7 세포는 30 µM 농도에서 세포 생존율이 10% 감소하였다. 또한 RAW264.7 세포에 LPS 2 µg/µl와 ASC 10 µM을 함께 처리하였을 경우 세포 생존율이 10% 감소하였다. 따라서 본 실험은 세포 생존율을 10% 미만으로 감소시킨 LPS 2 µg/µl와 ASC 10 µM 농도를 확립하여 실험을 수행하였다.

RAW264.7 세포에서 이차원 전기영동을 통한 단백질 발현 분석

RAW264.7 세포에 LPS 및 LPS와 ASC를 함께 처리한 후 단백질 발현을 관찰하기 위해 이차원 전기영동을 수행하였으며(Fig. 2), 이미지 분석은 분석 프로그램인 PDquest 를 이용하였다. 실험조건은 LPS 및 LPS와 ASC를 처리 후 이차원 전기영동을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 등전점 전기영동을 pH 3-10 과 pH 4-7 IPG strip을 이용하여 수행한 후 SDS-PAGE를 통해 단백질을 분리한 결과 약 800여개의 spot을 확인 할 수 있었으며, PDQUEST 이차원 전기영동 소프트웨어를 이용하여 각각 spot의 수치를 확인하였다. 그 중 ASC에 의해 발현 변화가 있는 100여개의 단백질을 분리하여 각각의 단백질에 대한 기능과 역할을 분석하였다(Table 2). 그러나 분자량 100 kDa, pI 9 이상에서는 spot을 관찰 할 수 없는 것으로 확인 되었다.

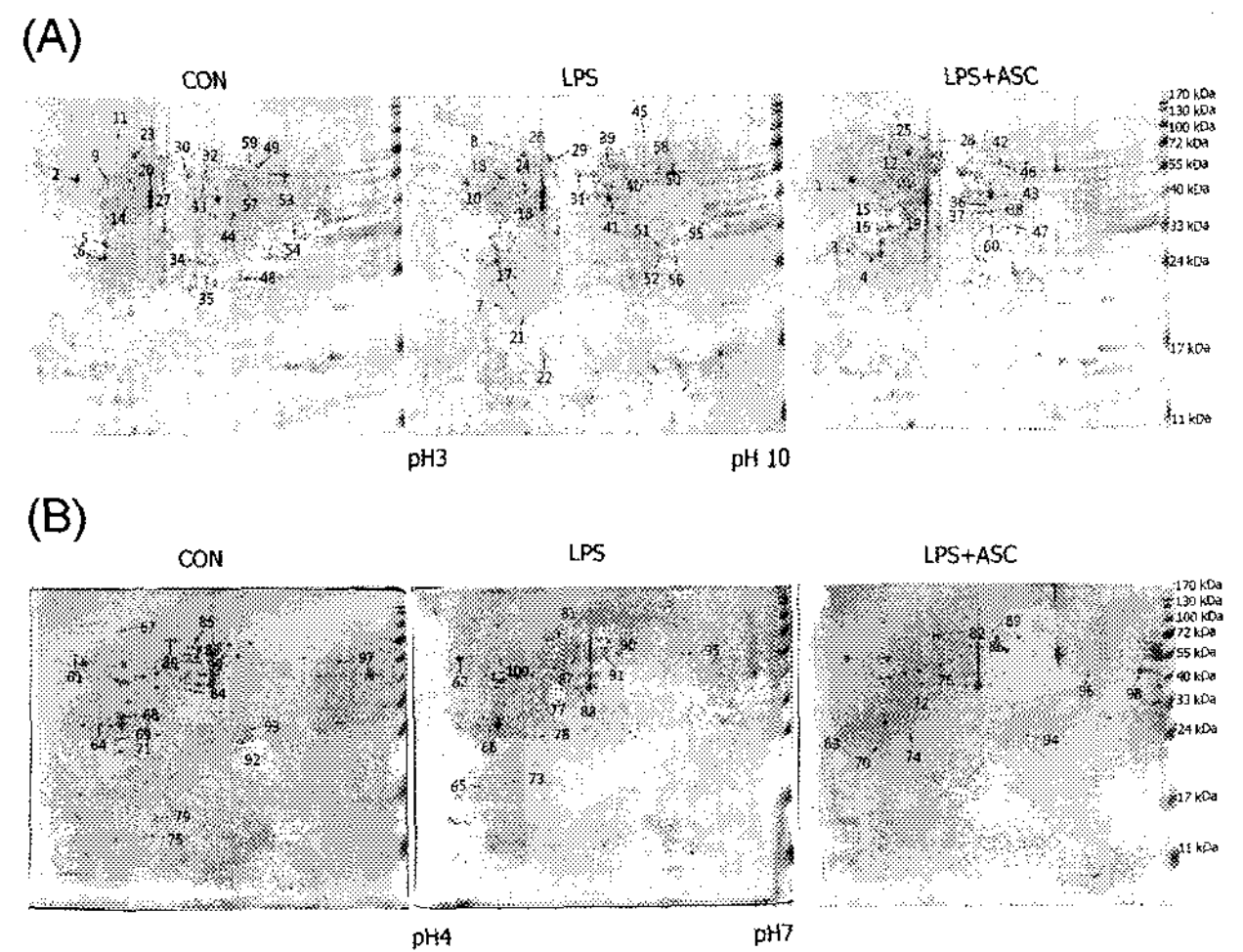


Fig. 2. Protein expression maps of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated for 12 hr with LPS (2 µg/µl) and ASC (10 µM) respectively or combinationally. Proteins from the whole lysates of RAW264.7 cells were separated on a pH 3-10 IPG strips in the first dimension and on an SDS-PAGE gel (12%) in the second dimension. The numbers indicated on the gels correspond to the gel numbers given in Table 2.

Table 2. Differentially Expressed proteins in ASC treated RAW264.7 cells

Spot No	Identified protein	Function	Localization	Accession NO	MW (kDa)	pI	MOWSEScore	Coverage (%)	LPS	ASC
1	Unnamed protein product			BAE41353	41	4.5	2.E+04	24	-1.18	2.1
2	ERp60	Binding protein	Endoplasmic reticulum	P14211	47	4.3	2.18E+07	37	-1.02	1.4
3	P32-RACK			AAH38075	31	4.8	1616	29	-1.48	1.3
4	14-3-3 protein epsilon	Binding protein	Cytoplasm	P62259	29	4.6	1042	23	1.0	2.2
5	Unnamed protein			BAE29904	27	4.9	1483	24	1.2	1.3
6	Tropomyosin gamma	Actin filament binding		P21107	32	4.7	7.85	14	-1.01	1.1
7	p23	Microtubule stabilization	Cytoplasm	P63028	19	4.8	3271	31	1.0	1.4
8	Rabaptin-5	Endocytic membrane fusion	Cytoplasm	O35551	99	5.0	16.5	5	-1.02	1.1
9	Unnamed protein			BAE39384	52	4.8	50.9	13	1.8	1.7
10	Dual specificity A-kinase anchoring protein 1	Binding protein	Endoplasmic reticulum	AAC27100	55	4.8	41.5	9	-1.67	1.2
11	Heat shock protein 90 kDa beta member 1	Transport	Endoplasmic reticulum	P08113	92	4.7	883	12	3.2	3.5
12	Rabaptin-5	Endocytic membrane fusion	Cytoplasm	O35551	99	5.0	117	6	-1.86	1.3
13	p55	Catalyze	Endoplasmic reticulum	P09103	57	4.8	4562	14	1.4	5.7
14	Unnamed protein product				47	4.8	849	24	1.2	1.2
15	Unnamed protein product			BAB30036	42	4.9	2.9	9	1.2	2.3
16	Similar to pleckstrin homology-like domain			XP911547	37	4.8	48	15	1.2	1.9
17	Rho-GDI beta	Regulates GDP/GTP	Cytoplasm	Q61599	22	5.0	1511	38	1.3	1.9
18	Vimentin			2078001	51	5.0	1.E+05	34	1.1	2.3
19	Unnamed protein			BAE22472	43	5.1	7.E+04	28	-1.1	-1.1
20	Tubulin beta-5 chain	Constituent of microtubule		P99024	49	4.8	1.E+04	21	-1.32	4.6
21	Ras-related protein Rap-2a		Cell membrane	Q80ZJ1	20	4.7	24.1	32	1.3	1.5
22	EF-1-gamma			XP925770	18	4.9	655	19	1.3	3.1
23	Heat shock 70 kDa protein 5	Assembly of multimeric protein complex	Endoplasmic reticulum	P20029	72	5.1	2.20E+07	26	1.1	1.9
24	MAP kinase p38 alpha	Production of cytokines	Cytoplasm	P47811	41	5.5	316	23	1.2	1.6
25	Catenin beta-1	Signal transduction	Cytoplasm	Q02248	85	5.5	245	9	-1.32	1.4
26	Testase-3	Spermatogenesis and fertilization	Membrane	Q9R158	78	5.7	204	8	1.6	2.1
27	Heat shock protein 60	Promote refolding	Mitochondria	P63038	60	5.9	2.E+05	24	1.2	2.1
28	GRP 75	Cell proliferation	Mitochondria	P38647	73	5.9	2.E+05	23	-1.49	2.2
29	Heat shock 70 kDa protein 8	Chaperone	Cytoplasm	P63017	70	5.4	3988	17	-1.21	1.8
30	TCP-1-epsilon	Chaperone	Cytoplasm	P80316	59	5.7	1570	13	-1.5	1.2
31	p58	Catalyze	Endoplasmic reticulum	P27773	56	6.0	2.E+05	22	1.1	1.8

34	C-terminal LIM domain protein 1	Cytoskeletal protein	Cytoplasm	O70400	35	6.4	7.44	16	1.1	1.2
35	unnamed protein product			BAE25105	30	6.8	48	16	1.4	1.6
36	Similar to RNA binding motif protein 17			63545814	40	6.6	14.7	14	-1.02	1.1
37	Peroxin-26		Peroxisome	Q8BGI5	34	6.3	847	25	1.1	1.3
38	Activation B7-1 antigen	Lymphocytes activation	Membrane	Q00609	34	7.0	1044	22	-1.08	1.2
39	AIP1	Disassembly of actin filament		O88342	66	6.1	5.E+05	31	1.1	1.0
40	Flotillin-1	Formation of caveolae	Cell membrane	O08917	47	6.7	3350	24	1.0	1.0
41	Cysteine-S-conjugate beta-lyase	Catalyze	Cytoplasm	Q8BTY1	47	6.5	1531	17	-1.15	-1.12
42	Protein MAIR	Tumor suppressor	Cytoplasm	Q8C006	57	6.7	442	14	1.6	1.8
43	Homeobox protein CHX10	Cell development	Nucleus	Q61412	39	7.1	763	24	1.5	1.4
44	Capg protein			13097498	38	6.5	27453	29	1.6	1.5
45	Alpha-adaptin C	Adaptor protein	Cell membrane	P17427	104	6.5	66.4	6	-4.48	-1.25
46	IMP cyclohydrolase	Catalyze		Q9CWJ9	64	6.3	135	10	1.4	1.2
47	Annexin A1	Exocytosis		P10107	38	7.1	1.24E+06	38	1.3	1.3
48	PGAM-B	Catalyze		Q9DBJ1	28	6.8	2.E+05	43	1.5	1.5
49	Pyruvate kinase isozyme M2	Catalyze		P52480	57	7.4	7469	23	1.2	1.3
50	Annexin A11	Binding protein	Nucleus	P97384	54	7.5	476	12	1.0	-1.09
51	hypothetical protein XP_921701			82931970	32	7.3	326	26	1.9	-1.42
52	VDAC-2		Mitochondria	Q60930	31	7.4	535	19	1.6	1.2
53	Pyruvate kinase isozyme M2	Catalyze		P52480	57	7.4	1.20E+08	28	1.0	-1.79
54	Natural killer cell receptor LY49W2			AAG10158	30	8.4	54.5	21	3.0	1.8
55	LDH muscle subunit	Catalyze	Cytoplasm	P06151	36	7.8	70.6	18	1.6	1.0
56	Lipoma HMGIC fusion partner precursor		Membrane	Q8BM86	21	7.9	389	10	1.3	1.1
57	Pyruvate kinase isozyme M2	Catalyze		P52480	57	7.4	9128	14	-1.02	-1.19
58	Pyruvate kinase isozyme M2	Catalyze		P52480	57	7.4	1.E+05	15	1.3	1.8
59	TGF-beta receptor type I	Signal transduction	Membrane	Q64729	56	7.2	13.4	4	1.8	1.5
60	Unnamed protein product			BAE22496	35	6.4	113	16	-1.36	-1.18
61	Calnexin precursor	Binding protein	Endoplasmic reticulum	P35564	67	4.5	6.32	6	-3	-2.02
62	ERp60	Promote folding	Endoplasmic reticulum	P14211	47	4.3	289	15	-1.75	-5.3
63	q subcomponent binding protein	.	.	AAH38075	31	4.8	252	26	-3.64	-4.4
64	Unnamed protein product	.	.	BAC 30908	30	5	5796	20	-1.42	-1.94
65	Unnamed protein product	.	.	BAE37711	22	4.8	181	16	-2	-20.8
66	Similar to A-kinase anchor protein 13 isoform 2 isoform 17	.	.	XP925288	26	4.6	4.36	11	-1.16	-2.65
67	Rabaptin-5	Actin filament binding	Cytoplasm	O35551	99	5	3.34	5	-3.18	-2.63
68	Bcl-2-like 1 protein	Potent inhibitor of cell death	Mitochondria	Q64373	26	4.9	176	18	-1.33	-1.83
69	Proteasome zeta chain	.	.	XP620109	20	4.9	6899	32	-1.05	-1.7

70	Hypothetical protein LOC74890 isoform 1	.	.	XP132350	18	4.7	56.8	8	-1.61	-10.3
71	Breakpoint 3 isoform 1	.	.	XP892058	20	4.9	60.5	10	0.006	-1.63
72	Unnamed protein product	.	.	BAE39114	42	4.7	14.1	15	-1.38	-1.85
73	Glycine cleavage system H protein	Catalyze	Mitochondria	Q91WK5	18	4.8	13.5	15	-1.58	-2.57
74	Heat shock protein 60 (Hsp60)	.	.	XP912216	30	5.1	140	16	-1.71	-6
76	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	.	.	Q9DBC7	43	5.3	155	16	-1.73	-3.3
77	UNR-interacting protein	Transcription factor	Cytoplasm	Q9Z1Z2	38	5	369	19	-3.55	-4.27
78	26S proteasome-associated UCH37-interacting protein 1	.	.	Q8BKT8	27	5.1	22	23	-1.9	-2.8
79	Hypothetical protein XP_898013 isoform 2	.	.	XP903106	14	4.7	63.8	26	-7.57	-3.63
80	Heat shock 70 kDa protein 5 (GRP 78)	Protein folding	Endoplasmic reticulum	P20029	72	5.1	689	13	-1.9	-2.1
81	Heat shock 70 kDa protein 5 (GRP 78)	Protein folding	Endoplasmic reticulum	P20029	72	5.1	689	13	3.0	1.2
82	Heat shock 70 kDa protein 5 (GRP 78)	Protein folding	Endoplasmic reticulum	P20029	72	5.1	7697	22	-2.5	-2.0
83	Glypican-6 precursor	Cell growth	Cell membrane	Q9R087	63	5.3	117	11	-4.2	-1.83
84	Actin (Beta-actin)	Cell motility	Cytoplasm	P60710	41	5.3	850	13	-2.3	-4.73
85	Heat shock 70 kDa protein 5 (GRP 78)	Protein folding	Endoplasmic reticulum	P20029	72	5.1	3.78E+06	28	-2.23	-1.7
86	Heat shock 70 kDa protein 5 (GRP 78)	Protein folding	Endoplasmic reticulum	P20029	72	5.1	9.E+05	22	-1.61	-11.3
87	Archaeometzincin-1	Protein folding	Endoplasmic reticulum	Q8BVF9	55	5.7	114	9	-1.5	-4.31
88	Similar to cytoplasmic beta-actin isoform 1	.	.	XP619399	37	5.3	2.E+04	21	-1.8	-1.64
89	Heat shock 70 kDa protein 8	Chaperone	Cytoplasm	P63017	70	5.4	5819	23	-4.6	-2.8
90	Coiled-coil domain-containing protein 22	.	.	Q9JIG7	70	5.7	380	10	-9.0	-6.8
91	Heat shock protein 60 (Hsp60)	Protein folding	Mitochondria	P63038	60	5.9	2744	17	-4.0	-4.0
92	Carboxy terminus of Hsp70-interacting protein	Chaperone	Cytoplasm	Q9WUD1	34	5.7	7.39	11	-2.63	-20.0
93	Apolipoprotein E precursor (Apo-E)	Binding protein	Secreted protein	P08226	35	5.6	2.34	16	-2.5	-47.6
94	PtdIns transfer protein alpha (PtdInsTP)	Catalyze	Cytoplasm	P53810	31	6.0	7.65	15	-1.9	-18.1
95	V-ATPase H subunit	Transport	.	Q8BVE3	55	6.2	855	13	-1.3	-3.17
96	Dynein light intermediate chain 2	.	.	Q6PDL0	54	6.1	1055	23	-5	-3.74
97	Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase	.	Cytoplasm	O88844	46	6.5	12.5	12	-3.1	-2.8
98	4'-phosphopantetheinyl transferase	Catalyze	Cytoplasm	Q9CQF6	35	6.7	595	20	1.3	0.006
99	Vimentin	.	.	P20152	53	5.1	3344	13	-2.53	-3.03
100	Tubulin beta-6 chain	Constituent of microtubule	.	Q922F4	50	4.8	125	19	-1.73	-3.5

질량 분석기(MALDI-TOF)를 이용한 단백질 발현 분석

800여개의 spot 중 ASC에 의해 발현 변화를 보인 100개의 spot은 MALDI-TOF를 통해 분석하였다(Fig. 3). 분석한 단백질은 분자량 20% 내외, pI값 0.5% 내외의 기준으로 선택하였다. 선택된 단백질 100개 중 약 37%의 단백질이 LPS와 ASC에 의해 발현이 조절됨을 확인할 수 있었으며, 발현 변화가 확인된 단백질 중에는 염증 유발에 관여하는 단백질로 vimentin 단백질과 ERP60 (calreticulum) 단백질 및 Heat Shock Protein (HSP)이 포함되어 있었다. 또한 세포사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2 단백질과 세포사멸을 유도하는 단백질인 Annexin family 단백질이 포함되어 있었다.

단백질 기능 분석 프로그램(Swiss-Port/TrEMBL)을 이용한 단백질의 기능 및 위치별 분류

질량 분석기를 통하여 발현 변화가 확인된 단백질은 PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)와 Swiss-Port/TrEMBL (<http://au.expasy.org/sport>)의 정보를 이용하여 분류하였다. 분류 결과 동정 가능한 단백질 중 세포성장 및 유지(cell growth and maintenance) 그리고 세포대사(metabolism) 관련 단백질이 50% 이상을 차지하였고 그 밖에 전사(transcription factor), 세포결합(binding), 신호전달(signal transduction), 단백질 폴딩(protein folding) 및 면역반응(immune response) 관련 단백질 등에서 발현 변화를 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 또한 발현차이를 보인 단백질들을 세포내 위치별로 분류해 본 결과 세포질에 존재하는 단백질이 20%, 소포체에 위치한 단백질이 14%로 확인되었다. 그 밖에 세포막에 9%, 미토콘드리아에 6% 및 핵 내 단백질이 3% 정도 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 4B).

세포 성장과 관련된 단백질은 전체 단백질 중 20%로 확인되었다. 확인된 단백질 중 vimentin, Bcl-2, tubulin beta-6

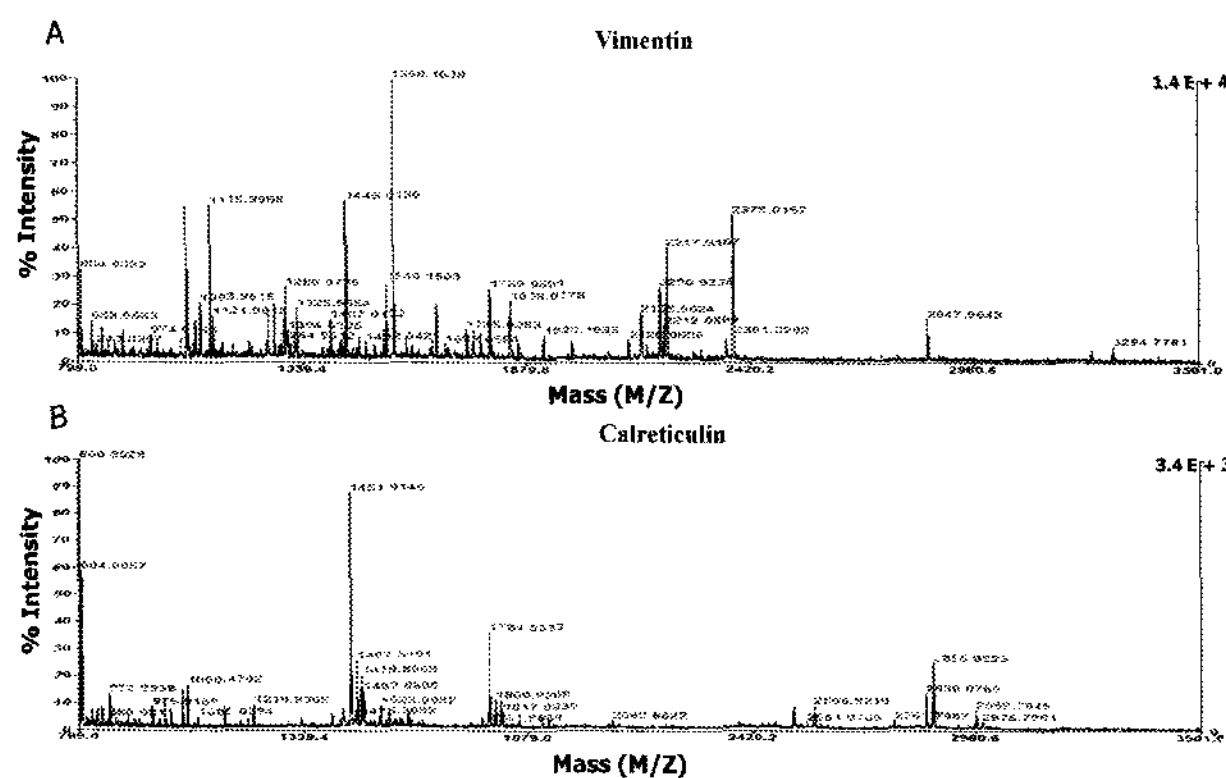


Fig. 3. MALDI-TOF spectrum of tropic fragments of 2-D gel spot. MALDI-TOF MS peptide mass fingerprint spectrum obtained from crude mixture after in-gel tropic digest of spots. The spectra of MALDI-TOF obtained from Vientiane (A) and Calreticulin (B).

chain, β -actin이 다른 단백질에 비해 발현 변화의 차이가 크게 나타나는 것으로 확인되었다. Vimentin은 RAW264.7 세포에 LPS 처리 시 단백질 발현양이 2.5배 감소하였으며, LPS와 ASC를 함께 처리한 경우 ASC에 의해 단백질의 발현양이 3배 감소하였다. Bcl-2는 RAW264.7 세포에 LPS 처리 시 단백질의 발현양이 1배 감소하였고, LPS와 ASC를 함께 처리 시 단백질의 발현양이 2배 정도 감소하였다. Tubulin beta-6 chain은 LPS에 의해 단백질 발현양이 1.5배 감소하였으며, LPS와 ASC를 함께 처리한 경우 ASC에 의해 단백질 발현양이 3.5배 감소하였다. β -actin은 LPS를 처리한 경우 단백질의 발현양이 2배 감소하였고, LPS와 ASC를 함께 처리 시 단백질의 발현양이 4.5배 감소하는 것으로 확인되었다.

세포대사 조절에 관련된 단백질은 전체의 14%를 차지하였으며, 확인된 단백질에는 Mitochondrial precursor, ptdInsTP 등이 포함되어 있었다. 세포대사 관련 단백질인 Mitochondrial precursor와 ptdInsTP는 RAW264.7 세포에 LPS 처리 시 단백질의 발현양이 1.5배 감소하였으며, LPS와 ASC를 함께 처리한 경우 ASC에 의해 단백질 발현양이 2.5배 감소하였다.

세포결합 관련 단백질은 전체의 9%를 차지하며, ERP60 (calreticulum)과 apolipoprotein E (ApoE), annexin A11이

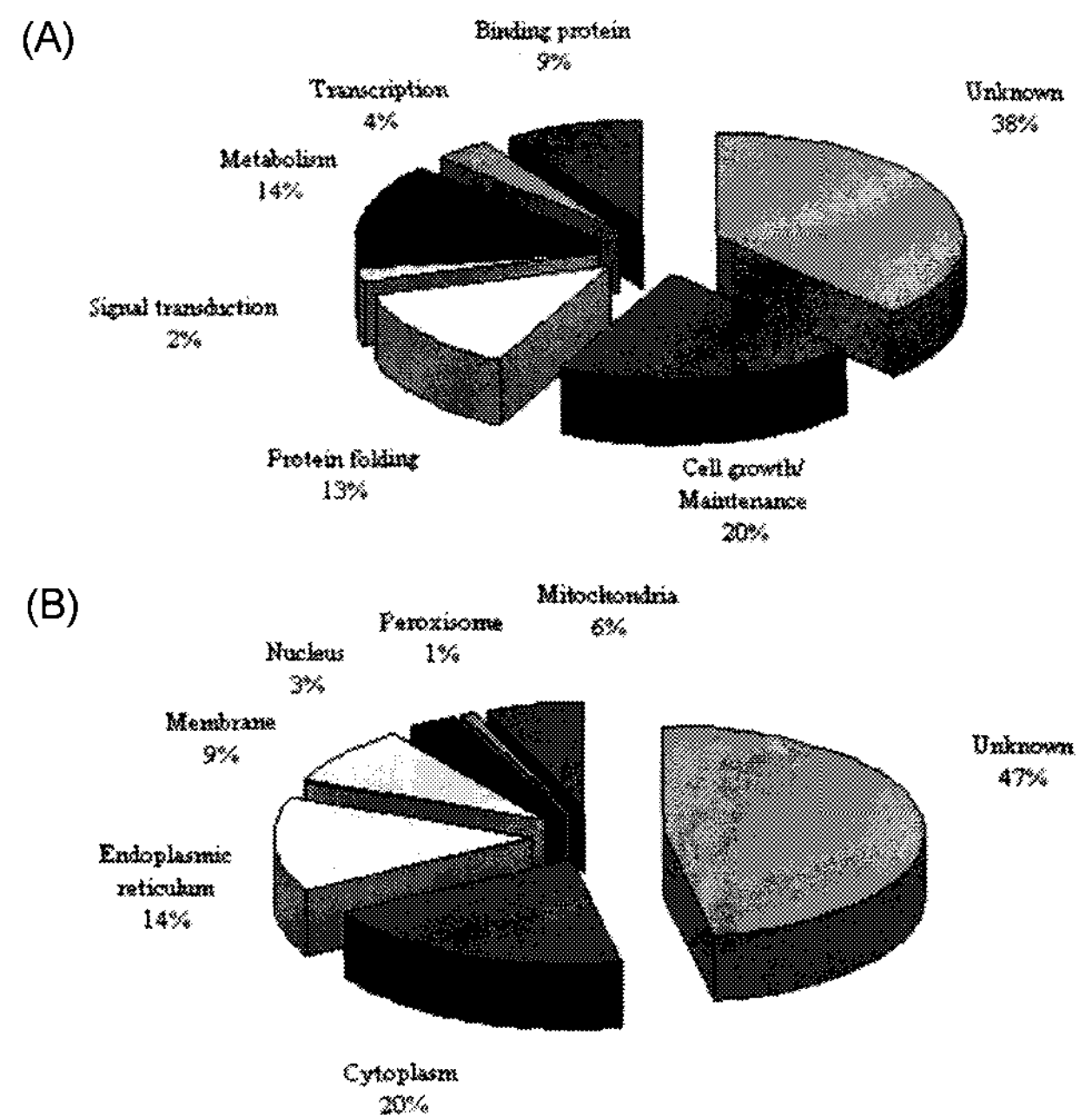


Fig. 4. Functional classification and Localization of the differentially expressed proteins identified. Pie Charts representing the distribution of the 100 identified proteins according to their biological functions are shown. Assignments were made based on information from the NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed) and the Swiss-Port/TrEMBL protein knowledgebase (<http://au.expasy.org/sport>) websites.

RAW264.7 세포에서 LPS와 ASC에 의해 단백질 발현이 변화하는 것으로 확인되었다. ERP60과 ApoE 단백질은 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 단백질 발현량이 각각 2배 감소하였고, LPS와 ASC를 함께 처리한 경우에도 ASC에 의해 단백질 발현량이 각각 4배 감소하였다. 그러나 annexin A11은 RAW264.7 세포에 LPS 처리 시 단백질의 발현량이 1배 증가하였고, LPS와 ASC를 함께 처리한 경우 ASC에 의해 단백질의 발현량이 2배 감소하였다.

RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 확인

LPS를 처리한 RAW264.7 세포에 ASC 처리로 단백질 발현이 조절된 4개의 유전자는 RT-PCR을 수행하여 프로테오믹스 결과를 재확인 하였다. ERP60, rabaptin-5, vimentin, β -actin 유전자의 mRNA 발현 정도는 농도계(Quantity One, BIO-Rad)를 이용하여 수치화하였다. ERP60 mRNA와 β -actin mRNA의 발현 양상은 LPS를 단독으로 처리하였을 경우 보다 LPS와 ASC를 함께 처리하였을 경우 각각 mRNA의 발현은 4배 감소하였고(Fig. 5A and 5B), vimentin mRNA의 발현은 LPS와 ASC를 함께 처리하였을 때 3배로 감소하였다(Fig. 5C). 반면 Rabaptin-5 mRNA 발현은 LPS와 ASC를 함께 처리하였을 경우 발현량이 3배 정도 증가하였으며(Fig. 5D), 이 결과는 이차원 전기영동에 의한 단백질 발현 변화와 RT-PCR을 통한 mRNA의 발현변화가 일치함을 확인할 수 있었다.

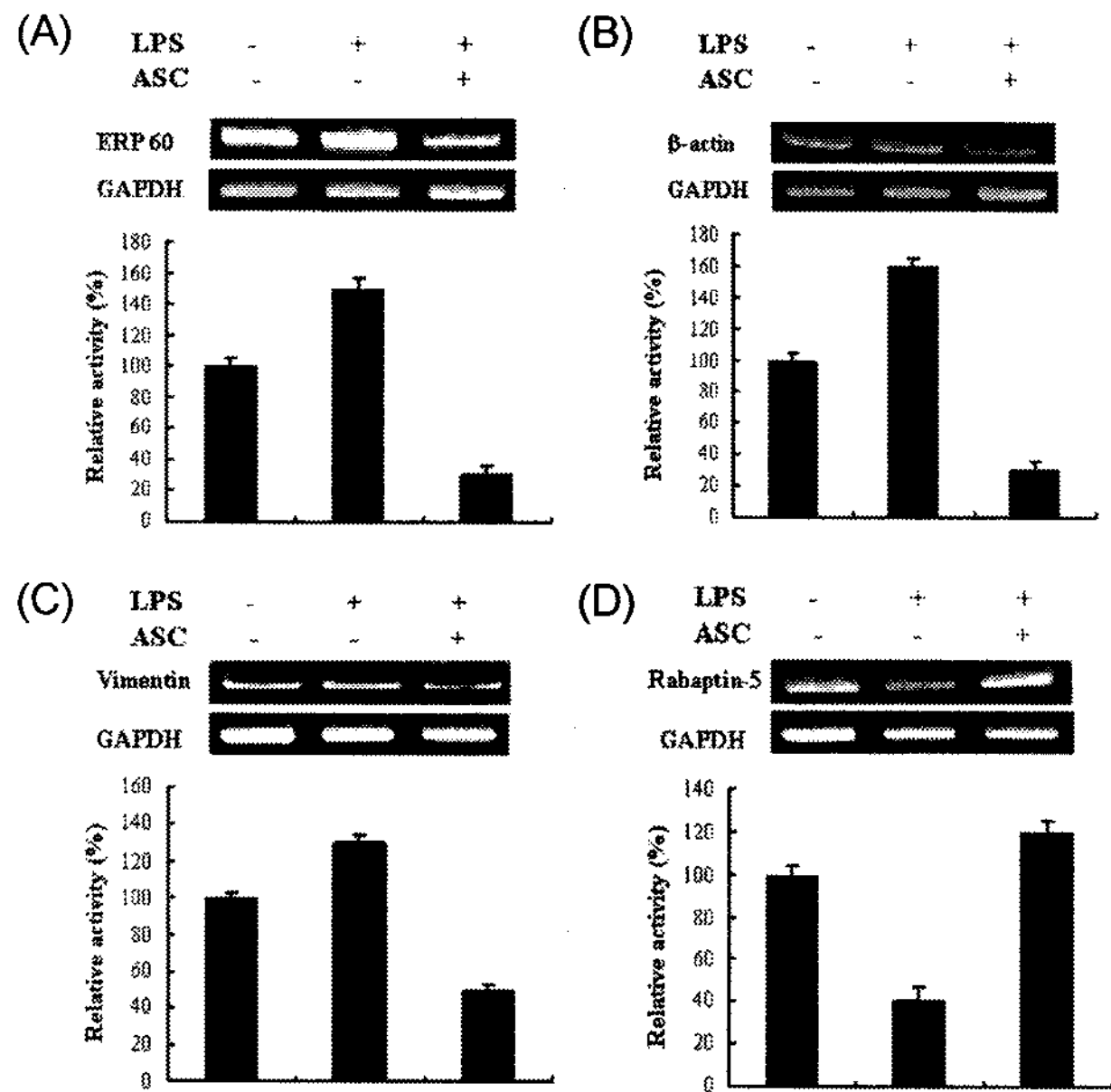


Fig. 5. RT-PCR analysis of gene expression in RAW264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with LPS (2 ug/ml) and ASC (10 uM) respectively or cominationally for 12 hr. And the expression of selected genes were determined by RT-PCR. The specific primers used in RT-PCR were described in Table 1. GAPDH was used as the control, and the data presented are averages of three experiments.

결과 및 고찰

Ascochlorin (ASC)은 항바이러스성, 항균 그리고 항암 효과를 가지는 생리활성 물질로 알려져 있으나[16,19] 면역세포에 ASC에 의해 조절되는 세포 내 단백질에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 LPS를 처리한 RAW264.7 세포에 ASC에 대한 단백질 변화 양상을 확인하기 위해 이차원 전기영동을 이용한 프로테오믹스 연구를 수행하였다.

프로테오믹스는 단백질을 체계적으로 연구하는 학문으로 지놈을 연구하는 지노믹스와는 구별되며 단백질은 특정 조건에서 지놈으로부터 발현되는 다양한 단백질을 선별할 수 있는 학문의 영역으로 최근에는 프로테오믹스의 개선된 방법으로 단백질들을 효과적으로 분리하거나 제거하는 기술이 개발되고 있다[2,36,39,43,51].

대식세포주인 RAW264.7 세포에 LPS 및 LPS와 ASC를 함께 처리한 후 이차원 전기영동을 한 결과 단백질 발현 차이가 있는 100개의 단백질을 확인 할 수 있었으며, 이들은 pH 3-10 범위에서 60개, pH 4-7 범위에 40개의 단백질이 존재 하였다(Fig. 2).

확인된 단백질들을 기능 및 세포 내 위치별로 분류해 본 결과 기능에서는(cell growth and maintenance) 단백질이 20%를 차지하였으며, 위치에서는 세포질에 존재하는 단백질이 20%를 차지하였다. 그러나 아직 기능이나 세포내 위치가 알려 지지 않은 단백질도 많이 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

두드러진 발현 변화를 보인 단백질 중 vimentin, ERP60 (calreticulin), rabaptin-5, Bcl-2, annexin A11은 염증 작용과 세포 사멸과 관련된 것으로 알려져 있다[3,24,26,29].

항염증 반응과 관련된 단백질 중 ERP60은 유전자 발현과 분화조절, 그리고 세포의 항상성 유지에 중요한 칼슘 결합 단백질로 알려져 있으며[5,41,45], 또한 자가 면역 조절에서 표적 단백질로 보고되어져 있다[22]. 아울러 항염증 작용에도 ERP60이 관여하는 것으로 알려져 있다[12,13,26,35,40,46]. Table 2와 Fig. 5에 나타난 바와 같이 염증 반응에서 증가된 ERP60의 단백질과 유전자의 발현은 ASC의 처리에 의해 감소되었다. 이 결과는 염증 반응에서 ASC가 ERP60 단백질과 mRNA 발현 수준을 조절 하며 ASC가 항염증 작용을 조절하는 것으로 생각된다.

Heat shock protein (HSP)은 외부의 환경과 산화적 스트레스에 대해 세포를 보호하며, 염증반응에도 관련된 것으로 보고되고 있다[14,31]. 세포가 정상적인 범위 이상의 온도에 노출되면 HSP가 세포를 보호하는 역할을 하는 것뿐만 아니라[42], 염증이 진행되는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있는데[30], 본 연구 결과에서는 LPS에 의해 증가한 단백질 발현이 ASC 처리 시 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 ASC가 항염증 작용에 관여하는 것으로 사료된다.

LPS는 염증 반응과 아울러 사포사멸을 유도 하는 것으로 알려져 있다. 세포사멸(apoptosis)은 DNA에 손상을 주는 산화적 스트레스, UV 또는 독성물질과 같은 외부자극에 대해 세포가 이를 극복하지 못하고 스스로 죽음을 선택하는 것을 가리키며, 이러한 외부자극으로 인해 정상적인 대사를 하지 못하는 세포의 자살을 유도하여 개체의 항상성을 유지하는 것이다. 그러나 정상적으로 세포사멸이 유도되지 않을 경우, 암 발생 및 바이러스 감염 등에 의한 면역질환이 야기될 수 있다[15,21,28]. 감염(infection)에 의해 면역체계 활성화시 사이토카인의 분비와 림프구의 세포사멸이 증가 하는데[6,38,50], 염증의 확산을 막고 조직과 각 기관의 기능을 유지하는 방어 기전인 세포사멸 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다[18,29]. 본 연구에서는 몇몇의 세포사멸 과정에 관련된 단백질을 확인 할 수 있었다. 그 중 Vimentin은 세포 사멸시 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 LPS를 처리하여 염증 반응을 일으킨 RAW264.7 세포에 ASC의 처리 시 LPS에 증가된 vimentin이 ASC 처리 시 감소되는 것을 확인 하였다. 또한 Table 2에 나타난 것과 같이 세포사멸을 조절하는 단백질군인 Bcl-2 family 단백질 발현이 변화 하는 것을 확인 할 수 있었다.

Bcl-2 단백질은 세포사멸을 억제하는 antiapoptotic 유전자로 알려져 있으며[3], 이 단백질은 미토콘드리아 형태를 보존하여 세포사멸을 억제한다고 보고되었다[37]. 본 연구에서는 LPS를 처리한 RAW264.7 세포에 ASC의 처리 시 Bcl-2를 발현을 감소시켰으며, 이 결과는 ASC가 세포사멸에도 관여하는 것으로 사료된다.

다음으로 Rabaptin-5 (RABPT5)는 자가 면역 질환에서 autoantigen으로 작용하여 세포 사멸에 관여 하며, 이는 rabaptin-5 gamma와 rabaptin-5 delta 등으로 구성된 rabaptin-5의 family이며, 세포내 막 결합/융합(docking/fusion) 반응 안에 관여하는 GTP-binding 단백질 군이다[10,32]. Table 2에 나타난 바와 같이 LPS를 처리한 RAW264.7 세포에 ASC의 처리 rabaptin-5를 증가시켰으며, 이 결과는 ASC가 Bcl-2 뿐만 아니라 rabaptin-5를 조절하여 세포사멸에 관여하는 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통해 RAW264.7 세포를 이용한 면역세포 모델에서 ASC가 항염증 작용을 중심으로 하여 생리활성 조절기능을 확인 할 수 있었다. 향후 분자 기능 조절 연구와 전 임상 연구를 통해 ASC의 생리활성 조절 기능을 규명한다면 ASC는 항염증 및 항암활성을 갖는 약물로 개발될 것으로 기대된다.

요 약

아스코크로린(Ascochlorin, ASC)은 *Ascochyta viciae*로부터 추출된 프레닐페놀 물질로, 혈청 콜레스테롤과 트리글리세

라이드 수치를 감소시키고 종양 성장을 억제한다는 연구 결과가 보고되어 있다. 본 논문에서는 아스코크로린이 생리학적 혹은 병리학적인 작용과 염증반응에서 약리학적으로 유도되는 반응을 어떻게 조절하며, 이러한 메커니즘에 대해 이해하기 위해 mouse macrophage Raw264.7 세포에 아스코크로린을 처리하여 이에 대한 프로테오믹스의 특이적인 발현에 대해 분석하였다. 따라서 본 연구는 LPS를 처리한 mouse macrophage Raw264.7 세포에 아스코크로린을 처리하여 염증과정에 관련된 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해 프로테오믹스를 시행하였다.

Mouse macrophage RAW264.7 세포에 아스코크로린을 처리한 조건과 무처리한 조건으로 나누어 two-dimensional electrophoresis (2-D SDS-PAGE), matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) 와 bioinformatics 방법으로 아스코크로린을 처리한 mouse macrophage Raw264.6 세포의 프로테오믹스를 분석하였다. 그 결과 mouse macrophage Raw264.7 세포에 아스코크로린 처리 시 Calreticulin이 4배 감소, β -actin도 4배 감소 그리고 vimentin이 1.5배 감소함을 확인 할 수 있었다. 그러나 rabaptin 아스코크로린 처리에 의해 3배 증가함을 확인 할 수 있었다. 이러한 단백질 발현은 RT-PCR을 수행하여 결과에 대해 재확인 하였으며, 프로테오믹스와 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

따라서 본 연구를 통해 LPS 처리에 의해 활성화된 mouse macrophage RAW264.7 세포에 ASC를 처리한 후 이차원 전기영동법을 이용하여, 단백질의 발현 변화 및 양상을 규명하고 단백질 지도를 확립 하였으며, RAW264.7 세포를 이용한 면역세포 모델에서 ASC의 항염증 작용을 중심으로 생리활성 조절기능을 확인 할 수 있었다. 향후 분자 기능 조절 연구와 전 임상 연구를 통해 ASC의 생리활성 조절 기능을 규명한다면 ASC는 항염증 및 항암활성을 갖는 약물로 개발될 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 2006년도 대구가톨릭대학교 의과학연구소 연구비의 지원으로 수행되었습니다.

References

1. Adams, D. O. and T. A. Hamilton. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 283-318.
2. Adkins, J. N., S. M. Varnum, K. J. Auberry, R. J. Moore, N. H. Angell, R. D. Smith, D. L. Springer and J. G. Pounds. 2002. Toward a human blood serum proteome: Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**,

- 947-955.
3. Al-Sindi, K., M. H. Al-Shehabi and S. A. Al-Khalifa. 2007. Inflammatory myofibroblastic tumor of paranasal sinuses. *Saud. Med. J.* **28**, 623-627.
 4. Ando, M., S. Hirosaki, K. Tamura and T. Taya. 1984. Multiple regression analysis of the cholinesterase activity with certain physiochemical factors. *Environ. Res.* **33**, 96-105.
 5. Basu, S. and P. K. Srivastava. 1999. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor and peptide specific immunity. *J. Exp. Med.* **189**, 797-802.
 6. Bone, R. C. 1996. Sir isaac newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care. Med.* **2**, 1125-1128.
 7. Cho, H. J., J. H. Kang, J. Y. Kwak, T. S. Lee, I. S. Lee, N. G. Park, H. Nakajima, J. Magae and Y. C. Chang. 2007. Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK and Ap1-dependent mechanisms. *Carcinogenesis* **28**, 1104-1110.
 8. Dongre, A. R., G. Opitck, W. L. Cosand and S. A. Hefta. 2001. Proteomics in the post-genome age. *Biopolymers* **60**, 206-211.
 9. Ducan, D. B. 1995. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* **11**, 1-6.
 10. Eileithyia, S., B. Naomi and W. Philip. 1999. Human Rabaptin-5 is selectively cleaved by caspase-3 during apoptosis. *Journal of biological chemistry* **274**, 37583-37590.
 11. Gevaert, K. and J. Vandekerckhove. 2000. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* **21**, 1145-1154.
 12. Ghebrehiwet, B. 1989. Functions associated with the C1q receptor. *Behring. Inst. Mitt.* **84**, 204-215.
 13. Ghebrehiwet, B. and E. I. B. Peerschke. 1998. Structure and function of gC1q-R a multiligand binding membrane protein. *Immunobiology* **199**, 225-238.
 14. Gibran, N. S. and D. M. Heimbach. 2000. Current status of burn wound pathophysiology. *Clin. Plast. Surg.* **27**, 11-22.
 15. Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **40**, 770-776
 16. Hong, S. H., K. K. Park, J. Magae, K. Ando, T. S. Lee, T. K. Kwon, J. Y. Kwak, C. H. Kim, and Y. C. Chang. 2005. Ascochlorin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing activator protein-1-mediated gene expression through the ERK1/2 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **28**, 25202-25209.
 17. Hosokawa, T., M. Sawada, K. Ando and G. Tamura. 1981. Alteration of cholesterol metabolism by 4-O-methylascochlorin in rats. *Lipids* **16**, 433-438.
 18. Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, J. P. Cobb, A. Jacobson, T. G. Buchman and I. E. Karl. 1997. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit. Care Med.* **25**, 1298-1307.
 19. Kang, J. H., J. K. Kim, W. H. Park, K. K. Park, T. S. Lee, J. Magae, H. Nakajima, C. H. Kim and Y. C. Chang. 2007. Ascochlorin suppresses oxLDL-induced MMP-9 expression by inhibiting the MEK/ERK signaling pathway in human THP-1 macrophages. *J. Cell Biochem.* **102**, 506-514.
 20. Kang, J. H., K. K. Park, I. S. Lee, J. Magae, K. Ando, C. H. Kim and Y. C. Chang. 2006. Proteome analysis of responses to ascochlorin in a human osteosarcoma cell line by 2-D gel electrophoresis and MALDI-TOF MS. *J. Proteome Res.* **5**, 2620-2631.
 21. Kaufmann, S. H. and W. C. Earnshaw. 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* **256**, 42-49.
 22. Kishore, U., R. D. Sontheimer, K. N. Sastry, K. S. Zaner, E. G. Zappi, G. R. Hughes, M. A. Khamashta, P. Strong, K. B. Reid and P. Eggleton. 1997. Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions. *Biochem. J.* **322**, 543-550.
 23. Klose, J. 1999. Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **112**, 147-172.
 24. Korkbko, E. V., I. V. Korkbko, I. V. Palgova and S. L. Kiselev. 2006. Apoptotic cleavage of rabaptin-5-like proteins and a model for rabaptin-5 inactivation in apoptosis. *Cell Cycle.* **5**, 1854-1858.
 25. Magae, J., K. Munemura, C. Ichikawa, K. Osada, T. Hanada, R. F. Tsuji, M. Yamashita, A. Hino, T. Horiuchi and M. Uramoto. 1993. Effect of microbial products on glucose consumption and morphology of macrophages. *Biosci. Biotechnol. Biotechnol.* **57**, 1628-1631.
 26. Malhotra, R., S. Thiel, K. B. M. Reid and R. B. Sim. 1990. Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. *J. Exp. Med.* **172**, 955.
 27. Mann, M. 1999. Quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* **17**, 954-955.
 28. Meier, P., A. Finch and G. Evan. 2000. Apoptosis indevelopment. *Nature.* **407**, 796.
 29. Moisan, E., S. Chiasson and D. Girard. 2007. The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin. *Clin. Exp. Immunol.* **150**, 158-168.
 30. Morimoto, R. I., K. D. Sarge and K. Abravaya. 1992. Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem.* **267**, 21987-21990.
 31. Nanney, L. B., B. A. Wenczak and J. B. Lynch. 1996. Progressive burn injury documented with vimentin immunostaining. *J. Burn. Care Rehabil.* **17**, 191-198.
 32. Novick, P. and M. Zerial. 1997. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 496-504.
 33. O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
 34. Overall, C. M., J. L. Wrana and J. Sodek. 1989. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **264**, 1860-1869.
 35. Peerschke, E. I. B. and B. Ghebrehiwet. 1998. Platelet receptors for the complement component C1q: implications for hemostasis and thrombosis. *Immunobiol.* **199**, 239-249.
 36. Pieper, R. C., L. Gatlin, A. J. Makusky, P. S. Russo, C. R.

- Schatz, S. S. Miller, Q. Su, A. M. Estock, P. P. Parmar, M. Zhao, S. T. Huang, J. Zhou, F. Wang, R. Esquer-Blasco, N. L. Anderson, J. Taylor and S. Steiner. 2003. The human serum proteome: Display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics* **3**, 1345-1364.
37. Reed, J. C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* **124**, 1-6.
38. Rogers, H. W., M. P. Callery, B. Deck and E. R. Unanue. 1996. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* **156**, 679-684.
39. Sato, A. K., D. J. Sexton, L. A. Morganelli, E. H. Cohen, Q. L. Wu, G. P. Conley, Z. Streltsova, S. W. Lee, M. Devlin, D. B. DeOliveira, J. Enright, R. B. Kent, C. R. Wescott, T. C. Ransohoff, A. C. Ley and R. C. Ladner. 2002. Development of mammalian serum albumin affinity purification media by peptide phage display. *Biotechnol. Prog.* **1**, 947-955.
40. Sim, R. B., S. K. Moestrup, G. R. Stuart, N. J. Lynch, J. Lu, W. J. Schwaeble and R. Malhotra. 1998. Interactions of C1q and the collectins with the potential receptors calreticulin (cC1qR/collectin receptor) and megalin. *Immunobiology.* **199**, 208-224.
41. Singh, N. K., C. D. Atreya and H. L. Nakhashi. 1994. Identification of calreticulin as a rubella virus RNA binding protein. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12770-12774.
42. Somssich, I. E., E. Schmelzer, P. Kawalleck and K. Hahlbrock. 1988. Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 93-98.
43. Steel, L. F., M. G. Trotter, P. B. Nakajima, T. S. Mattu, G. Gonye and T. Block. 2003. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Molecular & Cellular Proteomics* **2**, 262-270.
44. Takatsuki, A., G. Tamura and K. Arima. 1969. Antiviral and antitumor antibiotics. XIV. Effects of ascochlorin and other respiration inhibitors on multiplication of Newcastle disease virus in cultured cells. *Appl. Microbiol.* **17**, 825-982.
45. Takemura, Y., N. Ouchi and R. Shibata. 2007. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J. Clin. Invest.* **117**, 375-386.
46. Tenner, A. J. 1998. C1q receptors: regulating specific functions of phagocytic cells. *Immunobiology* **199**, 250-264.
47. Togashi, M., S. Ozawa, S. Abe, T. Nishimura, M. Tsuruga, K. Ando, G. Tamura, S. Kuwahara, M. Ubukata and J. Magae. 2003. Ascochlorin derivatives as ligands for nuclear hormone receptors. *J. Med. Chem.* **46**, 4113-4123.
48. Togashi, M., H. Masuda, T. Kawada, M. Tanaka, K. Saida, K. Ando, G. Tamura and J. Magae. 2002. PPARgamma activation and adipocyte differentiation induced by AS-6, a prenyl-phenol anti-diabetic antibiotic. *J. Antibiot.* **55**, 417-422.
49. Tsuruga, M., H. Nakajima, S. Ozawa, M. Togashi, Y. C. Chang, K. Ando and J. Magae. 2004. Characterization of 4-O-methyl-ascochlorin-induced apoptosis in comparison with typical apoptotic inducers in human leukemia cell lines. *Apoptosis* **9**, 429-435.
50. Wang, S. D., K. J. Huang, Y. S. Lin and H. Y. Lei. 1994. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J. Immunol.* **15**, 5014-5021.
51. Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley and M. R. Wilkins. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090-1094.
52. Zamora, R., Y. Vodovotz and T. R. Billiar. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* **6**, 347-373.